

**Über das Verhalten verschiedener
Gewebeextrakte und Aminosäuren
im Warburg-Versuch**

Herbert J. Beil

Druck: Anneliese Schubert, München 5, Corneliusstraße 21, Telefon 21777

Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER CHIRURGISCHEN UNIVERSITÄTSKLINIK MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. med. E. K. FREY

ÜBER DAS VERHALTEN VERSCHIEDENER GEWEBSEXTRAKTE

UND AMINOSÄUREN IM WARBURG-VERSUCH

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Herbert J. Beil

aus Saint Louis



München 1958

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Privat-Dozent Dr. W. HARTENBACH
Mitberichterstatter:	Professor Dr. E. K. FREY
Dekan:	Professor Dr. K. KOLLE

Tag der mündlichen Prüfung: 11.9.1958

Herrn Prof. Dr. med. E.K. FREY darf ich meinen verbindlichsten Dank dafür aussprechen, daß er mir die Möglichkeit gegeben hat, in den Labors seiner Klinik tätig zu sein, um dort die experimentellen Untersuchungen für meine Doktorarbeit auszuführen.

Herrn OA. Priv. Doz. Dr. med. W. HARTENBACH danke ich für die Überlassung des Themas und für seine Unterstützung während meiner Tätigkeit im Labor der Klinik.

- In Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet -

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	9
LITERATURBESPRECHUNG	9
Eigenschaften der Gewebsextrakte	11
Nachweis der Gewebsextrakte	13
Material und Methodik	15
EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN	19
1. Gewebsextrakte	20
2. Aminosäuren u. a. Stoffe	30
DISKUSSION	40
ZUSAMMENFASSUNG	43
LITERATURVERZEICHNIS	45

Die bisher bekannten Methoden zum Nachweis der biologischen Aktivität der Gewebsextrakte sind mit dem Nachteil behaftet, einmal verhältnismäßig zeitraubend zu sein, ferner zum Teil einen großen Aufwand an Versuchstieren zu bedingen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die von I. W e i s vorgeschlagene Methode der manometrischen Gasstoffwechsellmessung nach Warburg herangezogen zum Nachweis der den Zellstoffwechsel aktivierenden Eigenschaften der Gewebsextrakte.

Es galt im besonderen herauszustellen, ob diese Stoffe, die freundlicherweise von der Chirurgischen Universitätsklinik München zur Verfügung gestellt wurden, im Stande sind, die Zellatmung eines defekten Gewebesystems zu erhöhen - gemessen am Sauerstoffverbrauch - ferner die Abhängigkeit der Wirkung von der Konzentration zu untersuchen.

Zunächst soll jedoch anhand der Literatur das Wesen der Gewebsextrakte in Bezug auf die Entwicklung der Theorie und Therapie, die Herstellung der Gewebsextrakte und deren Eigenschaften näher erläutert werden.

Bei Hornhauttransplantationen mit Gewebe aus lebenden Spenderaugen erreichte der Ophthalmologe F i l a t o w zwar gute Einheilung, jedoch wurde der Erfolg der Operation oft durch postoperative Trübung des Transplantats gemindert. Er versuchte dieses unangenehme Ereignis durch Augenbäder mit Hühnerembryonenextrakt zu verhindern, was ihm aber nur unvollständig gelang. Anders war es, als er praktischen Nutzen aus einer bemerkenswerten Erscheinung auf dem Gebiete der Gewebskulturen zog:

Bei überalterten und deshalb schlecht wachsenden Gewebskulturen kann man beobachten, daß dieselben wieder zum Wachsen angeregt werden können, wenn man ihnen ein kleines Stückchen der gleichen zoologischen und histologischen Gewebsart hinzufügt.

Dazu schreibt F i l a t o w selbst: "Auf Grund dieses Phänomens habe ich versucht, neben dem sich trübenden Transplantat in einem kleinen Bezirk der getrübbten Hornhaut deren oberste Schichten abzutragen und den er-

haltenen Defekt mit einem entsprechend großen Stückchen eines menschlichen Auges (das irgend einem Kranken wegen einer schweren Erkrankung entfernt worden war) zu decken.

Diese Methode war ein bemerkenswerter Erfolg und ist im Jahre 1933 veröffentlicht worden.

Dies war der Anfang der Gewebstherapie, die sich gegenwärtig so fruchtbar entwickelt hat."

Schon bald wurden auch Versuche gemacht, Plastiken mit Leichencornea durchzuführen, die sich als recht erfolgreich erwiesen. Besonders solches Material ergab gute Resultate, das längere Zeit, 6 - 7 Tage bei der Temperatur von $+2$ bis $+4^{\circ}\text{C}$ konserviert worden war. Hier zeigten sich sogar Aufhellungen der Trübung im postoperativen Verlauf. Daraus zog Filatow den wichtigen Schluß: "... daß die Konservierung von Leichenaugen bei tiefen Temperaturen zur Ansammlung bestimmter Substanzen in den Geweben des Auges führt, die den Prozeß der Anheilung des Transplantats und die regenerativen Fähigkeiten der getrübbten Stelle anregen."

Weitere Versuche zeigten, daß nicht nur konservierte Augen solche Substanzen enthielten, sondern auch andere Organe, ja sogar tierische und pflanzliche, falls sie unter gleichen oder ähnlichen Bedingungen vorbehandelt wurden.

Bei der theoretischen Auswertung all dieser Erscheinungen gelangte F i l a t o w zu seiner Hypothese der Gewebstherapie:

"Vom Organismus getrennte tierische oder pflanzliche Gewebe unterliegen bei der Einwirkung von Milieufaktoren, die ihre Lebenstätigkeit erschweren, einem biochemischen Umbau. Dabei werden in den Geweben Substanzen gebildet, die die biochemischen Prozesse fördern. Diese Substanzen, die es den Geweben ermöglichen, ihre Lebensfähigkeit unter ungünstigen Bedingungen zu erhalten, habe ich - Stimulatoren biologischer Herkunft - oder kurz - Biogene Stimulatoren - genannt."

F i l a t o w benützt zur Gewinnung der Gewebsextrakte folgende Gewebsteile:

Hautüberschuß, Placenta von Menschen; von Tieren (Heterogewebe): Lip-

penhaut, Innenseite des Oberschenkels, Muskeln, Hoden und Hodensackhaut.

Wichtig für die Anreicherung dieser Gewebsteile mit sog. biogenen Stimulatoren ist die Aufbewahrung unter "subletalen" Bedingungen. Diese Bedingungen werden erreicht durch Kältekonservierung von $+2$ bis $+4^{\circ}\text{C}$ über eine Zeitdauer von 6 - 7 Tagen.

Aus diesen Stoffen gewinnt er dann die Gewebsextrakte durch Zerkleinerung derselben mit einer zehnfachen Wassermenge; dieser Gewebsbrei bleibt bei einer Temperatur von $+15$ bis $+20^{\circ}\text{C}$ zwei Stunden stehen. Danach wird er 2 bis 3 Minuten gekocht und zweimal durch ein Papierfilter filtriert. Die Flüssigkeit wird sodann wieder zum Kochen erhitzt und in Ampullen abgefüllt; diese werden zugeschmolzen und eine Stunde lang bei 120°C im Autoklaven sterilisiert.

Er gibt ferner an, daß biologische Flüssigkeiten von in Kälte konservierten Leichen und Tieren wie z.B. Blut, Rückenmarksflüssigkeit, der Glaskörper und die intraokuläre Flüssigkeit auch biogene Stimulatoren enthalten. Ja, daß selbst im lebenden Organismus unter bestimmten Voraussetzungen solche Stoffe gebildet werden.

Eigenschaften:

Wie aus der Herstellungsmethodik hervorgeht, müssen die biogenen Stimulatoren thermostabil sein; bei ihrer Sterilisierung soll ihre Aktivität sogar leicht zunehmen. Sie können mit Wasser extrahiert und mit Wasserdampf destilliert werden. Sie sind weder Eiweiße noch Fermente, da ihre biologische Wirksamkeit nach chemischer Fällung des Eiweißes erhalten bleibt. Bei der Dialyse des Extraktes jedoch sinkt die Aktivität des nichtdialysierten Teils.

Die chemische Zusammensetzung ist ein organischer Stoffkomplex folgender Gruppen:

Dikarbon- und Dikarbonoxysäuren der fetten Reihe, ungesättigte aromatische Säuren und Oxsäuren, aromatische Säuren mit großem Molekulargewicht.

Von den biologischen Eigenschaften ist bemerkenswert, daß die Therapie mit diesen Gewebsextrakten, ohne Rücksicht auf die Applikationsart und deren oftmalige Wiederholung niemals anaphylaktische Erscheinungen hervorgerufen hat. Dabei spielt es keine Rolle, ob das Präparat humanem, animalischen oder pflanzlichen Geweben entstammt.

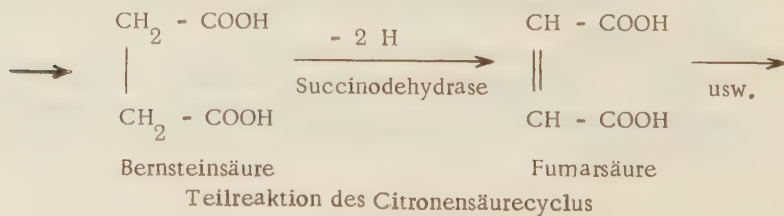
Die Behandlung eines Kranken mit Gewebsextrakten, die biogene Stimulatoren enthalten, wirkt nicht gezielt auf die erkrankte Stelle, sondern es erfolgt eine Stimulierung des gesamten Stoffwechsels und damit eine positive Wirkung auf den Gesamtorganismus. Auf diese Weise kommt es zur Gesundung.

F i l a t o w gibt eine große therapeutische Wirkungsbreite an: Nicht nur pathologisch entgleiste Stoffwechselvorgänge, sondern auch physiologische Prozesse werden günstig beeinflußt. Bakterielle und aseptische Entzündungen, degenerative Prozesse, Resorption von Exsudaten und Narben, vielerlei Hauterkrankungen erfahren durch die Therapie mit Gewebsextrakten eine Wendung zum Besseren. Die Magensaftsekretion soll verstärkt und die Funktion des Auges in Bezug auf Sehschärfe, Akkomodation und Farbempfindung heraufgesetzt werden.

Wie erklärt er sich nun diese Wirkung?

Zusammen mit I. Tschikalow und L.S. Scholnerowitsch konnte Filatow nachweisen, daß mittels mehrerer subcutaner Injektionen von Gewebsextrakten bei Kaninchen eine Aktivierung des Gehirnoxidationsfermentes, nämlich der Succinodehydrase stattfindet.

Diese Succinodehydrase aber spielt eine wichtige Rolle für den richtigen Ablauf des Kohlehydratstoffwechsels der Zelle. Sie stellt ein wesentliches Agens dar für die normale Abwicklung des Tricarbonsäure- und Citronensäurecyclus, sie gewährleistet nämlich durch die Dehydrierung der Bernsteinsäure bzw. ihres Natrium-salzes (=Succinat) deren Überführung in die Fumarsäure. (Krebs, Lynen).



Es erscheint also durchaus möglich, wenn die therapeutische Stimulierung dieses Fermentes mittels eines Gewebsextraktes im Sinne Filatows stattfindet, daß dieser Cyclus, als eine der elementaren, energieliefernden Reaktionen des menschlichen Körpers, ebenfalls eine Aktivierung erfährt.

Hiermit könnte man auch die große Wirkungsbreite und den günstigen Effekt auf das Allgemeinbefinden erklären,

Nachweis:

Die Betrachtung der oben aufgezählten chemischen Eigenschaften der biogenen Stimulatoren bzw. Gewebsextrakte weist schon darauf hin, daß die noch unvollständige Kenntnis dieser Eigenschaften nicht genügen wird, den Nachweis der biogenen Stimulatoren mit chemisch-analytischen Methoden zu erbringen.

Die therapeutische Wirksamkeit der biogenen Stimulatoren an Hand von Behandlungserfolgen Kranker zu beurteilen ist recht schwierig. Es ist zwar möglich, Krankenmaterial mit gleicher Krankheitsursache zu bekommen, wenn man aber Allgemein- und Ernährungszustand, Alter, Abwehrreaktionsbereitschaft und die verschiedene psychische Beeinflußbarkeit des einzelnen Kranken durch Arzt, Arzneiverabreichung in die Betrachtung einbezieht, dann werden die Vergleichsmöglichkeiten sehr schrumpfen.

Die bekannten und bisher verwendeten Nachweismethoden für die biogenen Stimulatoren sind sämtlich biologischer Natur. Filatow gibt folgende Tests an, um sie nachzuweisen:

1. durch Beschleunigung der Heilung von Hautdefekten bei Tieren;
2. durch Verstärkung von Gärungsprozessen sowie Vermehrung der Hefe;
3. durch Beschleunigung der Samenkeimung und des Pflanzenwachstums;
4. durch Steigerung der Fermentaktivität;
5. durch Verstärkung der mit dem Potometer bestimmten Resorptionsfähigkeit der Pflanzen;
6. durch Verstärkung der Atmung pflanzlicher Gewebe.

ad 1.) Hierzu verwendete Filatow Mäuse oder Kaninchen, denen er mit einem Bohrer an einer bestimmten Körperstelle (bei den Mäusen am Rücken, bei den Kaninchen an der Innenfläche des Ohres) einen runden Hautlappen entfernte. Sofort beginnend behandelte er nun alle Tiere jeweils mit einer täglichen Injektion. Die eine Gruppe erhielt subcutane Injektion von Gewebsextrakten, die andere, Kontrollgruppe, isotone Kochsalzinjektion. Durch Vergleich der Heilungsgeschwindigkeit bei den beiden Gruppen beurteilte er die Wirkung der Gewebsextrakte, bzw. ihren Gehalt an biogenen Stimulatoren.

Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß sie am lebenden tierischen Organismus durchgeführt wird und die hiermit erzielten Ergebnisse am ehesten einen Schluß zulassen, wie der menschliche Organismus bei Einführung der getesteten Substanz reagieren würde. Der Nachteil besteht darin, daß ein großer Aufwand an Versuchstieren notwendig ist, und daß es einige Tage dauert, bis man den Ausgang der Versuche sieht und deren Erfolg beurteilen kann. Oft bringt auch eine Sekundärinfektion den Versuch zum Scheitern. Aber auch im Tierversuch gelingt es natürlich nicht, in jeder Hinsicht unter gleichen Bedingungen zu arbeiten, da sicherlich nicht alle Tiere gleich reagieren.

Deshalb ist es verständlich, daß eine Methode gesucht wurde, bei der man nicht mit diesen Schwierigkeiten zu kämpfen hatte.

So gibt nun I. W e i s an zu glauben, in der manometrischen Methode der Gasstoffwechselmessung nach Warburg einen kürzeren und einfacheren Weg gefunden zu haben, den Nachweis der biogenen Stimulatoren in den Gewebsextrakten zu erbringen.

Als Substrat für ihre Versuche wählte sie für die eine Gruppe von Experimenten Ehrlich'schen Mäuseascites, verdünnt mit Ringerlösung als intaktes Gewebssystem, und ein Rattenleber-Homogenat als defektes System für die andere Gruppe. Die Gewebsextrakte stellte sie selbst teils nach den Angaben Filatows, zum Teil in etwas anderer Form aus Placenta, Rattenleber und -Milz her. Dabei verkürzte sie die Lagerungszeit, um damit etwas über die notwendige Dauer für die Bildung von biogenen Stimulato- ren zu erfahren.

Aus ihren Versuchsergebnissen schließt sie, daß es gar nicht notwendig ist, die zu extrahierenden Organe eine ganze Woche zu konservieren, sondern daß schon einige Stunden genügen, um biogene Stimulatoren entstehen zu lassen, ja, daß aus solchermaßen behandelten Organen die Gewebsextrakte eine "... stärkere Steigerung der Gewebsatmung hervorrufen, als Extrakte aus Organen, die eine Woche lagerten, auf keinen Fall aber eine geringere."

Insgesamt erhielt sie durch Zugabe der Gewebsextrakte zum Substrat eine Steigerung der Gewebsatmung, sie selbst kommt daher zum Schluß, "... daß mit dem Test der Beeinflussung der Gewebsatmung die biogenen Stimulatoren von Filatow erfaßt werden."

Material:

Von der Chirurgischen Universitätsklinik wurden mehrere, bereits in Ampullen abgefüßte Gewebsextrakte einer Überprüfung unterzogen, die aus der Muskulatur verschiedener Jungtiere gewonnen wurden. Es handelt sich einerseits um Muskelfleisch von Fischen, andererseits von Säugetieren. Die Extrakte wurden in 2 Fraktionen unterteilt, die eine Fraktion wasserunlöslich, die andere wasserlöslich. Es sollte durch diese Versuchsanordnung untersucht werden, ob den Lipoid-Anteilen gegenüber den Eiweißanteilen verschiedene Wirkung zukommt.

Die Präparate (Fraktionen) erhielten folgende Bezeichnungen:

1. DC 100 (=Extrakt aus Fischfleisch)
2. X5FKV 19 (=Extrakt aus Muskelfleisch vom Kalb)
3. FKV 22/10 (=Extrakt aus Muskelfleisch vom Kalb)

Zum Vergleich wurden 2 Gewebsextrakte überprüft, die im Handel als wirkungsvoll angepriesen werden, 1. WGH und 2. Placenta-S.

1. WGH wurde an der Chirurgischen Universitätsklinik, München, eingehend erprobt und hat sich, wie Herr Professor F r e y auf dem Bayerischen Chirurgen Kongress betonte, therapeutisch als völlig wirkungslos erwiesen. Experimentelle Unterlagen, aus denen die Wirkung dieses Präparates hervorgeht, fehlen.

2. Placenta-Sanabo: ist in seiner Wirkung bekanntlich sehr umstritten. Eigene Erfahrungen der hiesigen Klinik liegen vor.

Bei der papierchromatographischen Aufschließung dieser Gewebsextrakte, die gleichfalls im Laboratorium der Chirurgischen Universitätsklinik erfolgte (W. H o l z a p f e l), zeigte sich, daß diese u. a. mehrere Aminosäuren und chemisch nahe verwandte Stoffe enthalten. Es wurden deshalb auch diese getestet.

Als Substrat für alle Experimente diente ein Homogenat folgender Zusammensetzung: 5 g Schweineherz und 100 ml Puffer. Von dem bei -20°C gefrorenen und aufbewahrten Herz wurden aus dem Myocard Stückchen herausgeschnitten und sofort auf einer Apothekerwaage abgewogen. Darauf sofortige Zerkleinerung in einem Mixgerät zusammen mit Sörensen-Phosphatpuffer $p_{\text{H}} = 7,2$. Nach vollständiger Homogenisierung (es werden oft kleine Gewebestückchen hochgeschleudert, die an Wand und Deckel haften bleiben und welche man natürlich wieder in die Flüssigkeit zurückbringen muß) wurde die gesamte Flüssigkeit durch eine doppelte Lage von Verbandsmull in einen Kolben getrichtert. Diese Flüssigkeit wurde im Kühlschrank bei einer Temperatur von ca $+5^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Das Succinat (Natriumsalz der Bernsteinsäure = $\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{COONa} \\ | \\ \text{CH}_2 - \text{COONa} \end{array}$)

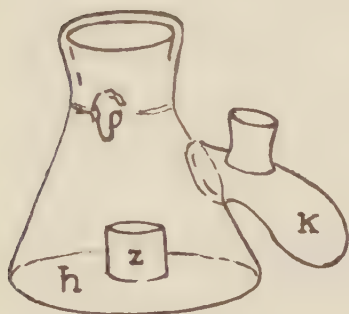
wurde so hergestellt, daß nach dem Mischen der Flüssigkeit im Hauptgefäß (= 1,5 ml Homogenat + 1,0 ml Testlösung oder Puffer = 2,5 ml) mit 0,5 ml Succinat eine m/100 Succinatlösung entstand. Also 0,972 g Succinat / 100 ml Aqua dest.

Zur Absorption des während des Versuchs sich bildenden Kohlendioxys wurden 0,25 ml einer 10%igen Kalilauge benutzt.

Die getesteten Gewebsextrakte und Aminosäuren wurden mit dem oben schon genannten Sörensen-Phosphatpuffer $p_{\text{H}} = 7,2$ auf die gewünschten Gammawerte verdünnt.

Für die Versuche wurde eine Apparatur der Firma Braun, Melsungen, verwendet. Die numerierten Manometer mit jeweils dazugehörigen Gefäßen wurden mit Quecksilber geeicht, das Quecksilber gewogen und daraus das Volumen der jeweils zusammengehörenden Einheiten errechnet (Dickens).

Als Manometerflüssigkeit wurde Brodielösung benutzt. Das Reaktionsgefäß (Abb. 1) bestand aus Hauptraum (h), Zentralgefäß (z) und Kipper (k).



Reaktionsgefäß (Abb. 1)

In h = 1,5 ml Homogenat +
1,0 ml Testlösung bzw.
Puffer;

In z = 0,25 ml Kalilauge;

In k = 0,5 ml Succinat.

Die Versuche wurden folgendermaßen ausgeführt:

Nachdem die oben angegebenen Stoffe in entsprechender Menge in die bezeichneten Gefäße einpipettiert waren, wurden die Schlitze eingefettet und mit Gummibändchen an die zugehörigen Manometer befestigt. Darauf wurden aus einer Druckflasche für ca 5 Minuten dekompensierter Sauerstoff durchgeleitet, um die atmosphärische Luft durch O_2 zu ersetzen. Nun wurde das System geschlossen und in das mit einem Thermostat konstant auf $37^\circ C$ gehaltene Wasserbad eingehakt und hier zum Ausgleich der Temperaturdifferenz ca 10 Minuten geschüttelt. Während dieser Prozedur dehnt sich natürlich das Gas aus, wie man deutlich an der starken Niveauänderung der beiden Manometerkapillaren sehen kann; man muß, um das Überfließen der Brodielösung zu verhindern, öfters kurz die Hähne öffnen zum Druckausgleich. Nach etwa 10 Minuten ist dies geschehen. Es wurde nun die Brodielösung im linken Schenkel der beiden Manometerkapillaren auf die Marke 15 eingestellt und der gering differierende Wert im rechten Schenkel notiert. Für diese Einstellung war es ebenfalls nötig, die Hähne kurz zu öffnen. Jetzt wurde das Manometer mit Gefäß aus dem Wasserbad gehoben und die Einheit so gekippt, daß das Succinat aus dem Kipper in den Hauptraum überlief, die Kalilauge jedoch in ihrem Zentralgefäß verblieb. Dann wurde wieder ins Wasserbad eingehakt und der Schüttelmechanismus in Bewegung gesetzt. Die nun er-

folgende Gasdruckveränderung wurde nach 5, 10, 20, 30 und 40 Minuten durch die Manometerflüssigkeit ausgeglichen und die Werte der Volumina-Änderung notiert, d. h. der linke Schenkel wurde wieder auf die Marke 15 eingestellt, der rechte Schenkel abgelesen und notiert. Die Umrechnung der abgelesenen Längenwerte in Raumwerte wurde mit folgender Formel durchgeführt:

$$x = h \cdot \left(\frac{V_G \cdot \frac{273}{T} + V_F \cdot \alpha}{P_0} \right) ;$$

x = Menge des gebildeten oder absorbierten Gases in mm^3 ;

h = Druckänderung in mm Brodielösung;

V_G = Volumen des Gasraumes in mm^3 ;

V_F = Volumen der zugesetzten Flüssigkeit in mm^3 ;

T = Absolute Temperatur des Versuches;

α = Bunsen Absorptions-Koeffizient des gebildeten Gases;

P_0 = Druck einer Atmosphäre, in mm Manometerflüssigkeit;

(1 Atmosphäre = 10 000 mm Brodielösung.)

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN

Die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde nur von den Versuchen durchgeführt, die auch eine übersichtliche Kurve lieferten. In manchen Fällen lagen die Zwischen- und Endwerte der einzelnen Konzentrationen sehr nahe beieinander. Hier wurde vorgezogen, die Ergebnisse, bzw. die Endwerte des Sauerstoffverbrauchs in Tabellen anzugeben.

Um die folgenden Abbildungen und Tabellen übersichtlich zu halten, wurden einige Abkürzungen verwendet. Es bedeuten:

HPS = Vergleichsversuch. Der Versuch wurde ohne Testlösung mit Homogenat, Succinat und Puffer durchgeführt.

HTS = Hauptversuch. Ebenfalls Homogenat und Succinat wie bei -HPS-, anstelle von Puffer, jedoch mit Testlösung.

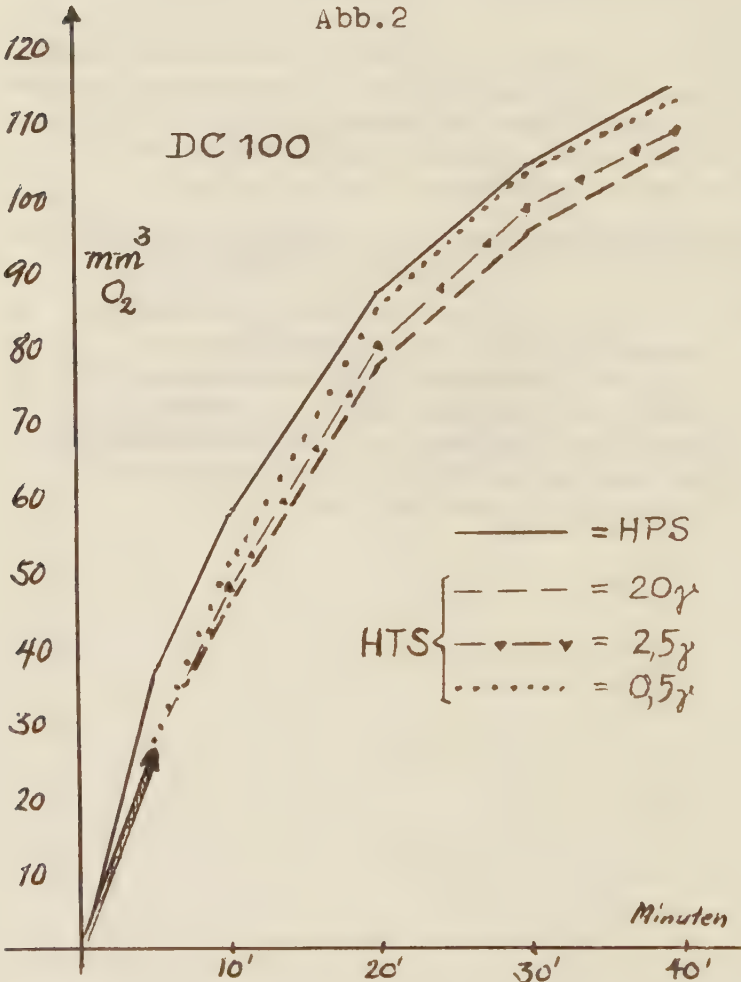
- = Hemmung der Succinodehydrase und des Sauerstoffverbrauchs.
- + = Aktivierung der Succinodehydrase und Zellatmung, d.h. Steigerung des Sauerstoffverbrauchs.

1. Gewebsextrakt DC 100

Originalkonzentration 20 γ im ml

Getestet wurden folgende Konzentrationen: 20/10/5/2, 5/1/0,5 γ

Abb. 2

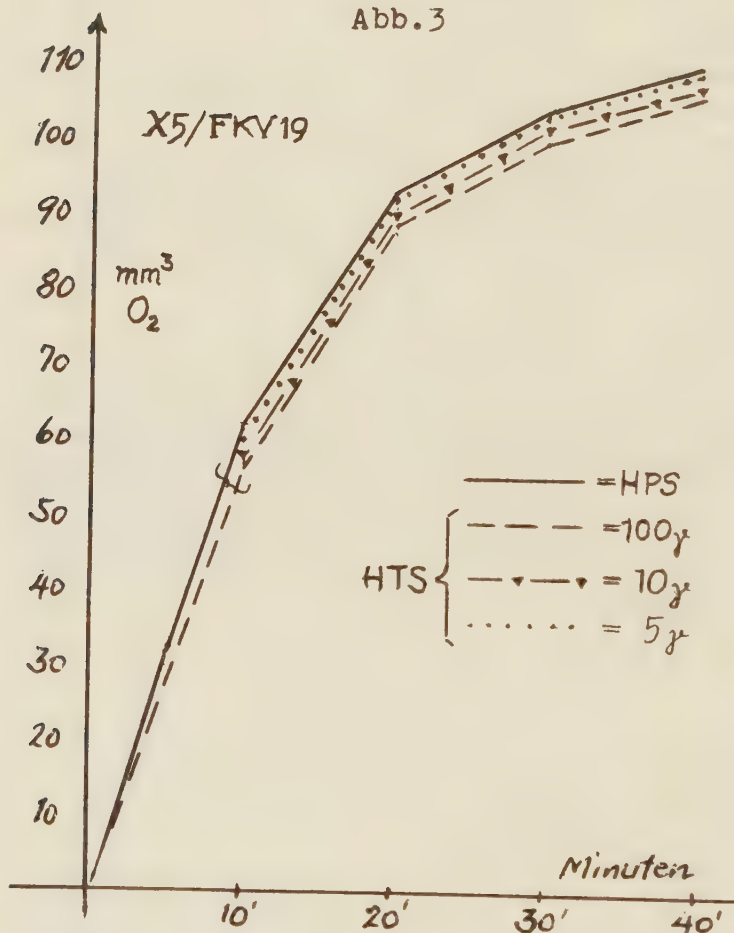


Ansatz: je 1 ml	Konzentration	O ₂ -Verbrauch nach 40 Min. Schütteln	Wirkung auf Zellatmung
Puffer	/	140,49 mm ³	/
DC 100	1,0 γ	126,4 mm ³	-
Puffer	/	73,36 mm ³	/
DC 100	5,0 γ	66,33 mm ³	-
Puffer	/	127,82 mm ³	/
DC 100	20,0 γ	123,98 mm ³	-
DC 100	10,0 γ	114,74 mm ³	-

Ergebnis: Wie Abb. 2 und obenstehende Tabelle zeigen, waren die Endwerte des Sauerstoffverbrauchs bei der Versuchsanordnung mit Puffer (= HPS) stets höher als die dazugehörenden Werte aus den Versuchsanordnungen mit den verschiedenen Konzentrationen der Testlösung DC 100. Es ist mit den hier verwendeten Gammawerten des Gewebsextraktes DC 100 nicht gelungen, die Zellatmung zu intensivieren. Diese wurde im Gegenteil gehemmt.

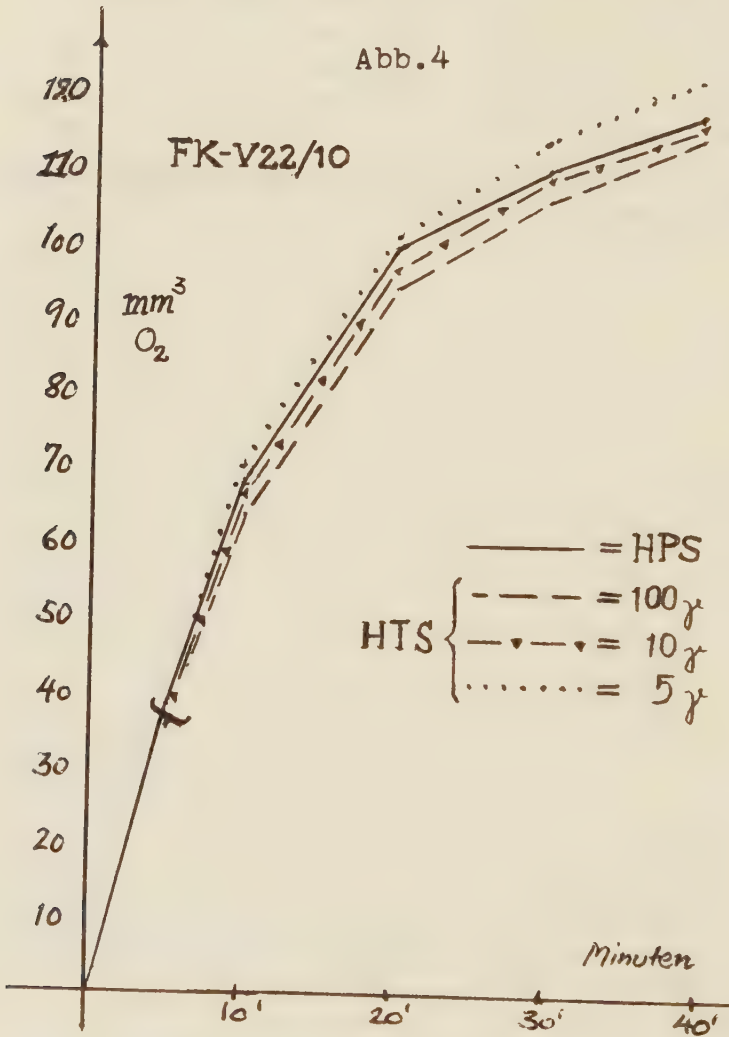
2. Gewebeextrakt X5/FKV 19Originalkonzentration 500 γ im mlGetestet wurden folgende Konzentrationen: 100/10/5/1,0/0,5 γ

Abb. 3



Ansatz: je 1 ml	Konzentration	O ₂ -Verbrauch nach 40 Min. Schütteln	Wirkung auf Zellatmung
Puffer	/	62,25 mm ³	/
X 5	1,0 γ	55,47 mm ³	-
X 5	0,5 γ	61,03 mm ³	-

Ergebnis: Wie Abb. 3 und Tabelle zeigen, ergab sich auch hier keine Aktivierung der Succinodehydrase.

3. Gewebsextrakt FK-V22/10Originalkonzentration 2500 γ im mlGetestet wurden folgende Konzentrationen: 100/10/5/2, 5/1,0/0,5 γ 

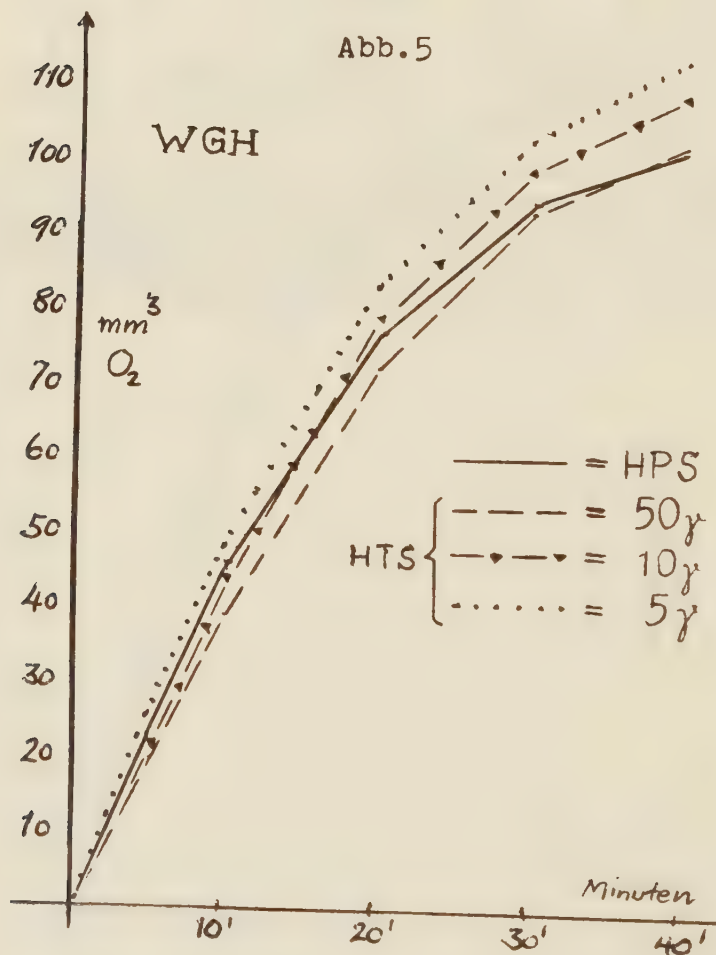
Ansatz: je 1 ml	Konzentration	O ₂ -Verbrauch nach 40 Min. Schütteln	Wirkung auf Zellatmung
Puffer	/	52,63 mm ³	/
FK-V22/10	2,5 μ	50,08 mm ³	-
FK-V22/10	1,0 μ	50,50 mm ³	-
FK-V22/10	0,5 μ	53,93 mm ³	+

Ergebnis: In Abb. 4 erreicht die "5 μ -Kurve" (punktiert) höhere Werte als die HPS Kurve (ausgezogene Linie). Das bedeutet, daß bei der Konz. von 5 μ des Gewebsextraktes FK-V22/10 eine Aktivierung der Succinodehydrase eingetreten ist und damit eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs. Versuche mit 0,5 μ brachten ebenfalls eine Aktivierung.

4. Gewebsextrakt WGH

Originalkonzentration war unbekannt.

Um trotzdem verschiedene Konzentrationen testen zu können, wurde der Wert des X5/FKV 19 = 500 γ im ml) angenommen: Getestet wurden:
 50/10/5/2,5/1,0/0,5 γ

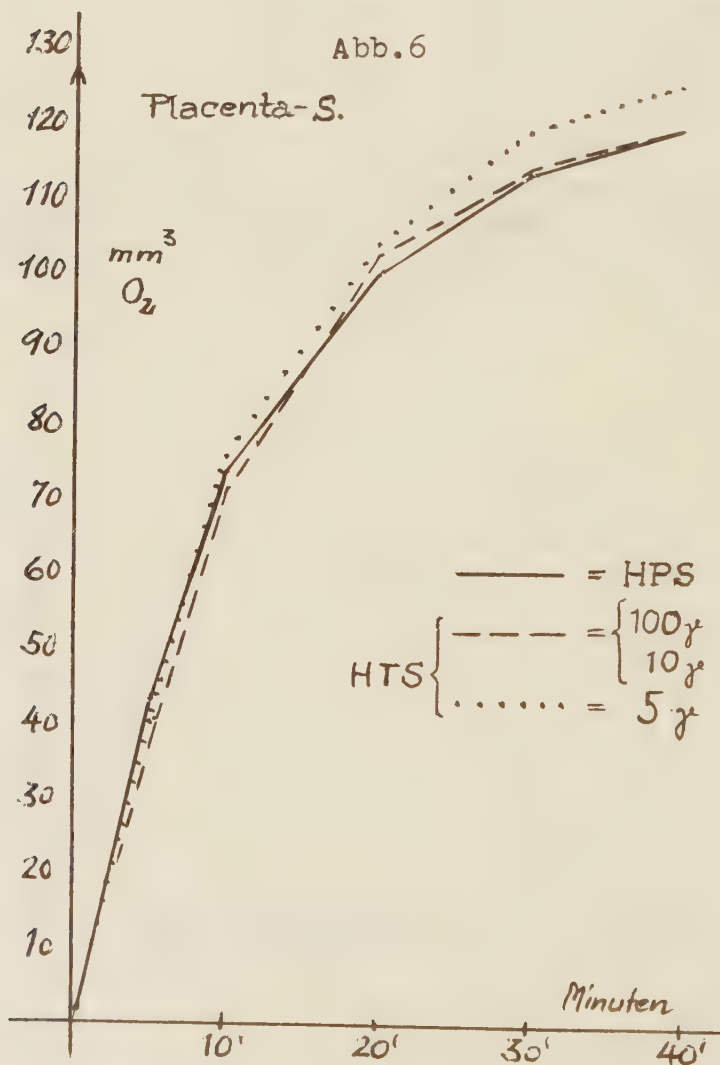


Ansatz: je 1 ml	Konzentration	O ₂ -Verbrauch nach 40 Min. Schütteln	Wirkung auf Zellatmung
Puffer	/	52,63 mm ³	/
WGH	2,5 μ	46,52 mm ³	-
WGH	1,0 μ	50,75 mm ³	-
WGH	0,5 μ	54,3 mm ³	+

Ergebnis: Wie die Abb. 5 zeigt, erreichten "Pufferversuch" und der Versuch mit angenommenen 5 μ Testlösung den gleichen Endwert. 50 μ und 10 μ , ebenso wie 0,5 μ (Tabelle) wirkten aktivierend.

5. Gewebeextrakt Placenta S.

Originalkonzentration unbekannt

Angenommene Konz. 500 γ im ml (s. Seite 26, WGH)Getestete Konzentrationen: 100/10/5/2,5/1,0/0,5 γ 

Ansatz: je 1 ml	Konzentration	O ₂ -Verbrauch nach 40 Min. Schütteln	Wirkung auf Zellatmung
Puffer	/	115,99 mm ³	/
Plac.S	2,5 γ	114,83 mm ³	-
Plac.S	1,0 γ	117,57 mm ³	+
Plac.S	0,5 γ	122,08 mm ³	+

Ergebnis: Mit den Konzentrationen 5,0/1,0 und 0,5 γ wurde eine Aktivierung der Zellatmung erzielt.

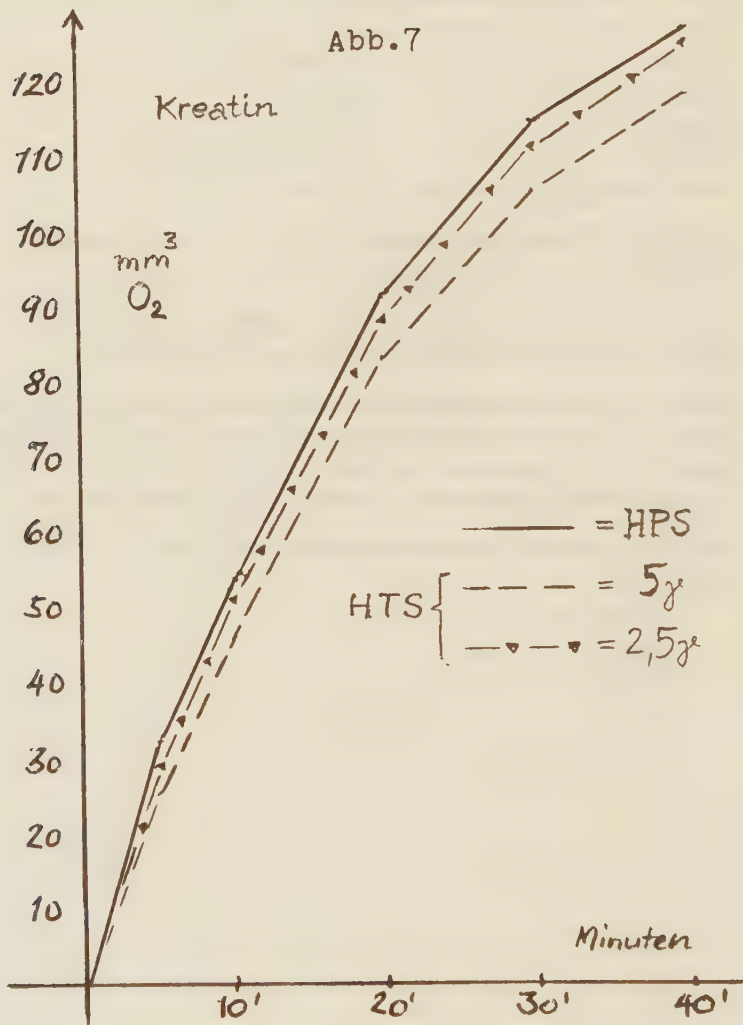
Die Konzentrationen 100 γ und 10 γ ergaben die gleichen Werte, sodaß in Abb. 6 100 γ (gestrichelt) auch für die "10 γ Kurve" gilt.

Bei der papierchromatographischen Untersuchung dieser Gewebsextrakte wurden u. a. mehrere Aminosäuren und chemisch ähnliche Stoffe gefunden. Da es interessierte, ob nicht einige dieser Substanzen die aktivierende Wirkung ausmachten, wurden folgende Stoffe getestet:

Kreatin, Kreatinin, Histamin-di-hydrochlorid, Histidin, Threonin und Leucin.

1. Kreatin

Getestet wurden folgende Konzentrationen: 500/200/20/5,0/2,5/1,0/0,5 γ

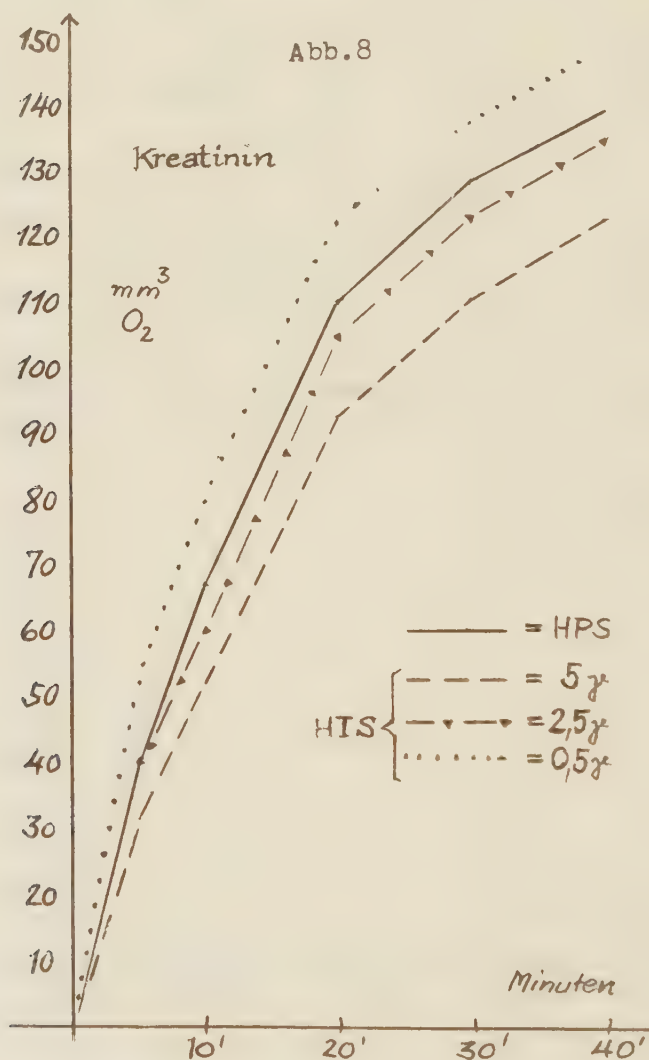


Ansatz: je 1 ml	Konzentration	O ₂ -Verbrauch nach 40 Min. Schütteln	Wirkung auf Zellatmung
Puffer	/	107,27 mm ³	/
Kreatin	500 μ	100,4 mm ³	-
Kreatin	200 μ	96,62 mm ³	-
Kreatin	20 μ	102,14 mm ³	-
Puffer	/	132,28 mm ³	/
Kreatin	1,0 μ	122,42 mm ³	-
Kreatin	0,5 μ	129,92 mm ³	-

Ergebnis: Mit den oben angegebenen Konzentrationen wurde in keinem Falle eine Steigerung der Gewebsatmung erreicht.

2. Kreatinin

Getestet wurden folgende Konzentrationen: 2000/1000/500/200/20/5,0/
2,5/1,0/0,5 γ

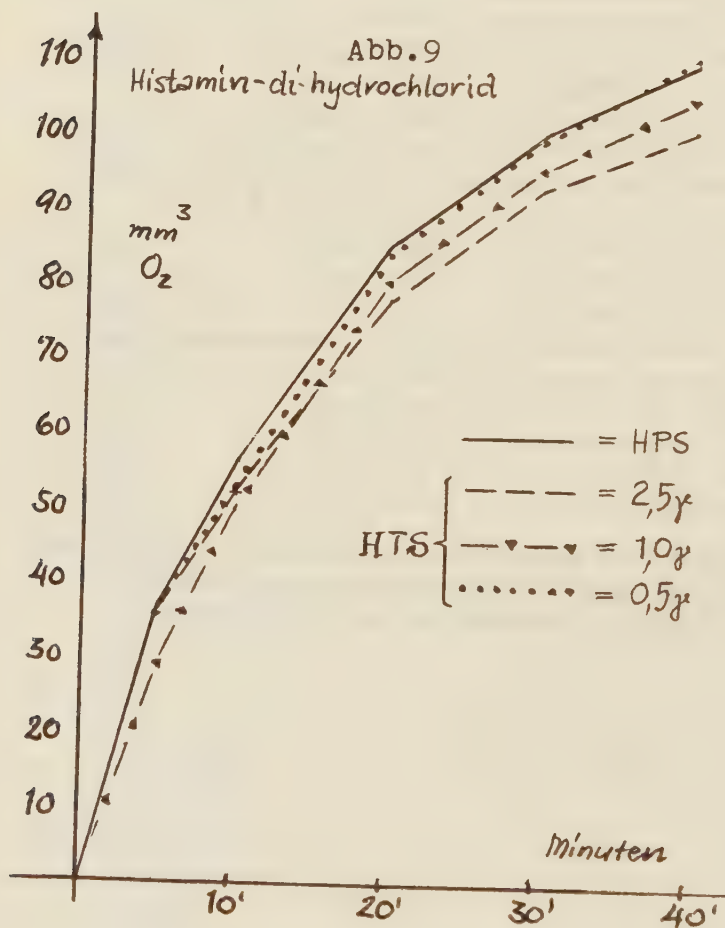


Ansatz: je 1 ml	Konzentration	O ₂ -Verbrauch nach 40 Min. Schütteln	Wirkung auf Zellatmung
Puffer	/	118,94 mm ³	/
HTS	2000 γ	109,98 mm ³	-
HTS	1000 γ	117,5 mm ³	-
Puffer	/	55,02 mm ³	/
HTS	500 γ	52,04 mm ³	-
HTS	200 γ	49,25 mm ³	-
HTS	20 γ	54,85 mm ³	-
Puffer	/	78,92 mm ³	/
HTS	1,0 γ	73,39 mm ³	-
HTS	0,5 γ	80,11 mm ³	+

Ergebnis: Mit Ausnahme der Verdünnung von 0,5 γ , die eine schwache Aktivierung der Succinodehydrase bewirkte, haben alle anderen oben angegebenen Konzentrationen die Atmung gehemmt.

3. Histamin-di-hydrochlorid

Folgende Konzentrationen wurden getestet: 100/10/5/2, 5/1, 0/0, 5 γ



Ansatz: je 1 ml	Konzentration	O ₂ -Verbrauch nach 40 Min. Schütteln	Wirkung auf Zellatmung
Puffer	/	115,99 mm ³	/
HTS	100 μ	110,94 mm ³	-
HTS	10 μ	114,45 mm ³	-
HTS	5,0 μ	120,98 mm ³	+

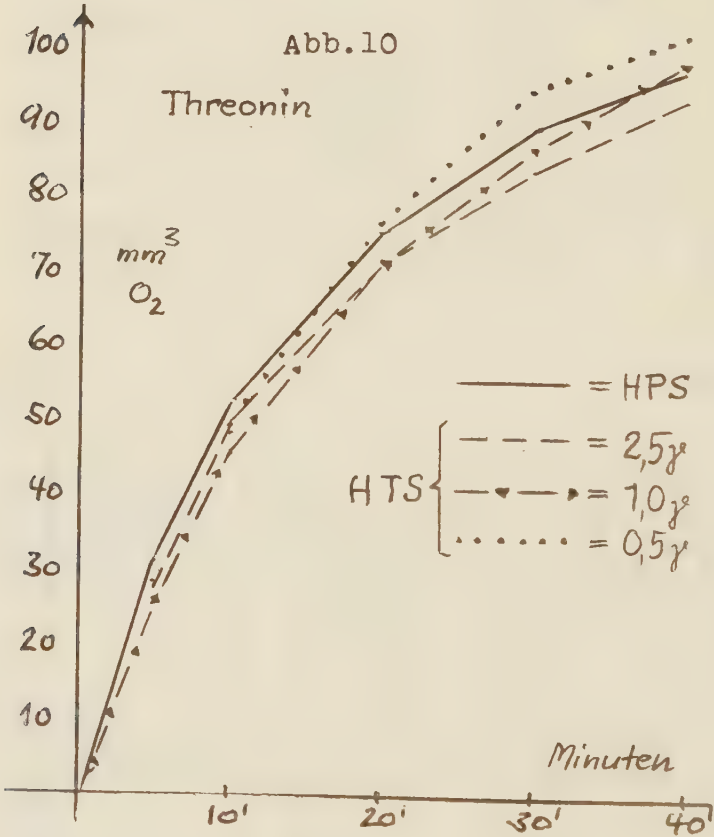
Ergebnis: Die Konzentration 5,0 μ zeigte eine Aktivierung der Zellatmung.

4. Histidin

Ansatz: je 1 ml	Konzentration	O ₂ -Verbrauch nach 40 Min. Schütteln	Wirkung auf Zellatmung
Puffer	/	44,03 mm ³	/
HTS	100 μ	44,67 mm ³	+
HTS	10 μ	45,64 mm ³	+
HTS	5,0 μ	49,88 mm ³	+
Puffer	/	45,64 mm ³	/
HTS	2,5 μ	44,12 mm ³	-
HTS	1,0 μ	46,03 mm ³	+
HTS	0,5 μ	47,28 mm ³	+

5. Threonin

Folgende Konzentrationen wurden getestet: 100/10/5/2,5/1,0/0,5 γ



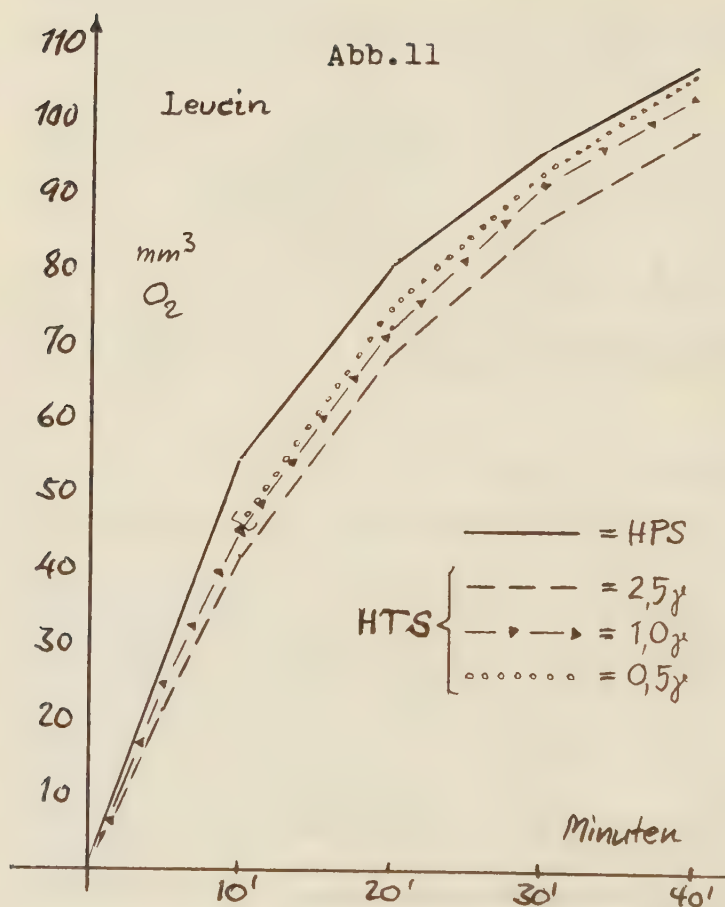
Ansatz: je 1 ml	Konzentration	O ₂ -Verbrauch nach 40 Min. Schütteln	Wirkung auf Zellatmung
Puffer	/	128,34 mm ³	/
HTS	100 μ	117,09 mm ³	-
HTS	10 μ	121,13 mm ³	-
HTS	5 μ	134,46 mm ³	+

Ergebnis: Mit den Werten 5,0 und 0,5 μ wurde eine leichte Steigerung der Succinodehydrase erreicht.

6. Leucin

Folgende Konzentrationen wurden getestet: 100/10/5/2,5/1,0/0,5 μ

Ansatz: je 1 ml	Konzentration	O ₂ -Verbrauch nach 40 Min. Schütteln	Wirkung auf Zellatmung
Puffer	/	136,73 mm ³	/
HTS	100 μ	125,09 mm ³	-
HTS	10 μ	128,97 mm ³	-
HTS	5 μ	137,59 mm ³	+



Ergebnis: Es wurde lediglich bei dem Wert von 5% eine ganz geringe Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs erreicht.

Die angegebenen Resultate stellen Mittelwerte dar, die im Durchschnitt aus 3 Versuchen ermittelt wurden. Die Leerwerte (Reaktion der einzel-

nen Stoffe ohne Homogenat und Succinat) waren so niedrig, daß sie vernachlässigt wurden, da in unserem Falle nur der Unterschied interessierte zwischen der Versuchsanordnung mit einem Zusatz an Gewebsextrakt und ohne Gewebsextrakt, (d.h. Ersatz des Extraktes durch Puffer).

DISKUSSION

Die Tatsache, daß einzelne der getesteten Aminosäuren und verwandte Stoffe eine Steigerung der Sauerstoff-Gewebsatmung hervorgerufen haben, während andere dieselbe gehemmt haben, läßt sich vielleicht zur Klärung der Frage heranziehen, warum nun die eine Gruppe von Gewebeextrakten einen negativen, die andere einen positiven Effekt auf die Succinodehydrase ausgeübt haben. Es erscheint durchaus möglich, daß die positive Wirkung abhängig ist von der Zusammensetzung aus diesen aktivierenden Aminosäuren oder deren überwiegenden Anteil im Verhältnis zu den hemmenden Aminosäuren.

Mit den Gewebsextraktivstoffen DC 100 und X5FKV 19 wurde bei keinen der hier getesteten Gammawerten eine Aktivierung der Succinodehydrase erhalten, dagegen mit den Präparaten FKV 22/10 und besonders WGH und Placenta-S gleich in mehreren der verwendeten Konzentrationswerte.

Es sei jedoch betont, daß sämtliche Ausschläge nur in einem Ausmaß vorgefunden wurden, die noch innerhalb der dem Versuch anhaftenden Fehlerbreite liegen. (International anerkannt $\pm 20\%$). Aktivierungen oder Hemmungen, aus denen sich eine eindeutige Beeinflussung der Succinodehydrase - Reaktion erkennen ließ, konnten nicht nachgewiesen werden.

Im einzelnen dürfen wir noch über die Möglichkeiten einige Angaben machen, die als Ursache für die von uns gesehenen geringen Verschiebungen in Betracht gezogen werden müssen.

Als einheitliche Linie ergab sich bei Abnahme des Gewebeextraktanteiles im Verdünnungsmittel (Puffer) eine proportional verlaufende Abnahme der hemmenden Wirkung auf den Sauerstoffverbrauch. Allerdings ist dies nicht besonders überraschend, da mit zunehmender Verminderung des Gewebeextraktes im Puffer dieser selbst den dadurch freiwerdenden Raum einnimmt (das Volumen bleibt ja konstant 1 ml Testlösung). Es ist deshalb zu erwarten, daß die Versuchsergebnisse mit diesen stark verdünnten Gewebsextrakten sich zumindest langsam den Meßwerten nähern, die man

aus Versuchen mit reinem Puffer (Vergleichsversuch) erhält,

Im Gegensatz hierzu wurde in einigen Fällen mit zwei relativ weit auseinanderliegenden Konzentrationen z.B. 5,0 μ und 0,5 μ aktivierende Wirkung, mit dazwischen liegenden Gammakonzentrationen jedoch indifferent oder gar hemmende Reaktion erzielt. Eine Erklärung für diese Erscheinung ließ sich nicht finden. Leider läßt sich der Gedanke nicht ganz verdrängen, daß die Ursache für dieses eigenartige Ergebnis in einem selbst verschuldeten Fehler liegen könnte. Mit dem üblichen Reinigungsprozeß (Chromschwefelsäure, Blutlaugensalz usw.) gelingt es leider nicht immer sicher, z.B. die Pipetten einwandfrei sauber zu bekommen, obwohl sie tadellos aussehen. Während des Einpipettierens der Lösungen in die Reaktionsgefäße aber bilden sich in solchen Pipetten nach dem Auslaufen der Flüssigkeit kleine Tröpfchen. Auch wenn man die Lösung in der Pipette nur äußerst langsam, gleichsam unter maximaler Ausnutzung der Adhäsionskräfte der Flüssigkeit herauslaufen läßt, tritt diese unangenehme Erscheinung auf. Dies war besonders beim Umgang mit Succinat zu beobachten, sodaß es auch in der Natur dieses Stoffes liegen könnte, bei deren Kontakt mit Glas dasselbe wasser- oder flüssigkeitsabstoßend zu machen. Daraus sich ergebende Schwankungen, wenn sie auch nur sehr gering sein mögen, dürften gerade beim Succinat eine schwerwiegende Konsequenz haben in Bezug auf den Ausgang des Versuches. Dies hängt zusammen mit der wichtigen Funktion des Succinats im richtigen Ablauf des Citronensäurecyclus. Die Leerversuche, in denen das Succinat fehlte, verliefen nahezu ohne meßbaren Sauerstoffverbrauch.

Eine andere, mögliche Fehlerquelle liegt in der Eichung der Reaktionsgefäße (Abb. 1 S. 17). Beim Abfüllen dieser Gefäße mit Quecksilber verbleiben kleine Luftblasen im Metall. Diejenigen, die sich zufällig zwischen Glaswand und Quecksilber befinden, lassen sich leicht entfernen. Da man jedoch annehmen muß, daß sich auch an anderen Stellen solche Luftblasen befinden, die man nicht sehen und wegen der Empfindlichkeit der Gefäße auch nicht durch kräftiges Umrühren mit einem Stäbchen entfernen kann, besteht die Gefahr, daß sich das, durch die Eichung errechnete Volumen nicht mit dem tatsächlichen deckt. Obwohl man die Eichung desselben Reaktionsgefäßes zusammen mit dem dazugehörigen Ma-

nometer dreimal durchführt und aus den errechneten Volumina das arithmetische Mittel bildet, kann dadurch der Fehler nicht ganz beseitigt werden. Es ist aber eine absolut genaue Kenntnis des Inhaltes eines Reaktionssystems Voraussetzung für die sinnvolle weitere Arbeit.

Bei der therapeutischen Anwendung des Gewebeextraktes X5FKV 19 in derselben Klinik (E. Schmidt) wurden täglich 5 Ampullen zu je 500 μ verabreicht und damit bei sonst therapieresistenten Krankheiten Erfolge gesehen. Diese Dosierung entspricht einer Menge von 0,035 μ pro 1 g Körpergewicht (wenn man ein Durchschnittsgewicht eines Patienten von 70 kg zugrunde legt).

In unseren Versuchen wurde mit einer Gewebsmenge von ca 0,0714 g gearbeitet. Diese Menge von Herzmuskelgewebe kam zusammen mit z.B. 0,5 μ einer Gewebsextraktmenge. Umgerechnet bedeutet das ein Verhältnis von ca 7 μ auf 1 g Gewebsgewicht, also einer etwaigen 200-fach stärkeren Dosis. Um nun zwischen therapeutischer Wirkung und dem Verhalten im Warburg-Versuch Vergleiche anstellen zu können, müßte die Konzentration noch wesentlich verringert werden. Eine so starke Verdünnung aber mit der erforderlichen Genauigkeit des Gammawertes des Gewebeextraktes herzustellen, war nicht möglich.

Im Tierversuch mit Meerschweinchen (E. Schmidt) erwies sich schon eine 50-fach höhere Dosierung als 0,035 μ auf 1 g Meerschweinchen, allerdings erst nach ziemlich langer i. m. Applikation, als so toxisch, daß die meisten Tiere zugrunde gingen.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Gewebsextrakte, Aminosäuren und chemisch verwandte Substanzen auf ihre Fähigkeit untersucht, die Sauerstoffatmung eines Schweineherzhomogenats positiv zu beeinflussen. Die Gewebsextrakte enthalten nach Filatow sogenannte "biogene Stimulatoren". Es sind dies komplexe Stoffe komplizierter Natur. Sie entstehen in vom Organismus abgetrennten Geweben, unter ungünstigen, sog. "subletalen" Bedingungen. Die Wirkung der biogenen Stimulatoren soll, wie der Name schon sagt, anregend sein und zwar sowohl auf physiologische als auch pathologische Vorgänge; letztere werden zur Heilung angeregt.

Filatow gibt selbst mehrere Methoden an, um die aktivierende Wirkung der Gewebsextrakte, bzw. der in ihnen enthaltenen "biogenen Stimulatoren" nachzuweisen. I. W e i s glaubt jedoch, mit dem Warburg-Versuch einen einfacheren und schnelleren Test gefunden zu haben. Es handelt sich hier um die manometrische Gasstoffwechsellmessung in Form des Succinodehydrase-Tests. Untersucht wurden in Verdünnungen zwischen 100 μ und 0,5 μ .

1. Gewebsextrakte: DC 100, X5FKV 19, FK-V22/10, WGH und Placenta-S.
Ergebnis: Nur mit den drei letzten Präparaten wurde in den niedrigen Gammawerten eine geringe Aktivierung der Succinodehydrase gemessen.

2. Aminosäuren u. ä. Stoffe: (Gammawerte zwischen 2000 μ und 0,5 μ)
 Kreatin, Kreatinin, Histamin, Histidin, Threonin und Leucin.
Ergebnis: Die hohen Konzentrationen zeigten deutliche Hemmung. Mit Kreatin wurde keine Aktivierung erreicht; alle anderen, hier angeführten Aminosäuren steigerten in den niedrigen Gammawerten die Sauerstoff-Aufnahme des Homogenats minimal.

Abschließend kommen wir zu folgendem Urteil:

Es ist in mehreren Fällen mit stark verdünnten Gewebsextrakten gelungen, Steigerungen der Succinodehydrase zu messen; allerdings weniger deutlich als erwartet. (I. W e i s berichtet über Steigerungen des Sauerstoffverbrauchs bis zu 90%).

Auf Grund der oben geschilderten Fehlermöglichkeiten muß bezweifelt werden, ob dieser Succinodehydrase-Test bessere Ergebnisse für die Beurteilung der biologischen Wirksamkeit eines Gewebsextraktes und seinem Gehalt an biogenen Stimulatoren liefert, als die bereits von Filatow angegebenen Nachweismethoden.

Da jedoch der Succinodehydrase-Test eine anerkannte und gut ausgearbeitete Methodik darstellt, eine spezifische Fermentreaktion der Zelle nachzuweisen, glauben wir nach unseren Ergebnissen sehen zu können, daß diese Fermentreaktion durch die von uns untersuchten Gewebsextrakte und papierchromatographisch isolierten Stoffe nicht beeinflußt wird.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Altschul, R.: Hühnerembryokulturen. Schweiz. Med. Wschr. Nr. 1,
Fedor, S.: 11 (1954)
- Bamann: Die Methoden der Fermentforschung (Sammelwerk)
Myrbäck: Verlag Georg Thieme, Leipzig 1941, 1 und 2
987 - 1015, 1340.
- Brandt, M.: Wege und Umwege der Sowjetmedizin. Bericht des
Osteuropa-Instituts an der Freien Universität Berlin.
Heft 29, 69, 1957
- Filatow, W.P.: Die biologischen Grundlagen der Gewebstherapie.
Sowjetwissenschaft, Naturwissenschaftl. Abteilung
Heft 1, 1952
- Filatow, W.P.: Biogene Stimulatoren. Münch. Med. Wschr. Nr. 31,
1955
- Holzapfel, W.: Kreatin und Kreatinin, Med. Dissert. i. Druck
- Krebs, H.A.: Die energieliefernden Reaktionen des Stoffwechsels. Klin. Wschr., Heft 5, 1957
- Lynen, F.: Coenzym A, ein Bindeglied zwischen energieliefernden und -verbrauchenden Reaktionen des Zellstoffwechsels. Klin. Wschr., Heft 5, 1957
- Schmidt, E.: Tierexperimentelle und klinische Beobachtungen bei der Anwendung eines Gewebsextraktivstoffes. Med. Diss. München 1958
- Weis, I.: Nachweis der Aktivität von Gewebsextrakten nach Filatow. Arzneimittelforsch. Heft 2, Febr. 1955

LEBENS LAUF

Als Sohn des Kaufmanns Johann B e i l und seiner Ehefrau Hertha B e i l geb. Beltz wurde ich am 15. November 1931 in Saint Louis, Mo., USA. geboren. Dort besuchte ich die Horace Mann Grammar School, bis meine Eltern und ich im Jahre 1941 nach Deutschland übersiedelten. 1943 trat ich in die Konradin-Kreutzer-Oberschule Meßkirch (Baden) ein. Infolge Kriegseinwirkung konnte ich dort nur 1 Jahr lang die Schule besuchen. 1946 zogen meine Eltern nach München, wo ich in der 3. Klasse der Luitpold Oberrealschule für Jungen Wiederaufnahme fand und diese Schul-ausbildung 1952 mit dem Abitur beendete.

Im selben Jahr begann ich an der Universität München mit dem Medizin-studium. Nach 5 Semestern legte ich 1955 die ärztliche Vorprüfung ab. 1957 begann ich im Laboratorium der Chirurgischen Universitätsklinik München mit den experimentellen Untersuchungen für meine Inaugural Dissertation. Im August 1958 beendete ich mein Med. -Studium in München mit dem Staatsexamen.

